

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

18.01.2005

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 4 年 1 月 2 3 日
Date of Application:

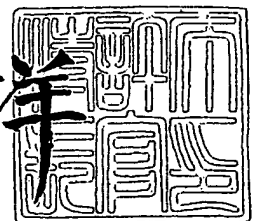
出 願 番 号 特 願 2 0 0 4 - 0 1 5 9 7 4
Application Number:
[ST. 10/C] : [J P 2 0 0 4 - 0 1 5 9 7 4]

出 願 人 キヤノン株式会社
Applicant(s):

2 0 0 5 年 2 月 1 7 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川 洋



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願
【整理番号】 260036
【提出日】 平成16年 1月23日
【あて先】 特許庁長官 今井 康夫 殿
【国際特許分類】 B01D 59/36
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内
 【氏名】 山道 淳太
【特許出願人】
 【識別番号】 000001007
 【氏名又は名称】 キヤノン株式会社
 【代表者】 御手洗 富士夫
【代理人】
 【識別番号】 100069017
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 渡辺 徳廣
 【電話番号】 03-3918-6686
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 015417
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1
 【包括委任状番号】 9703886

【書類名】特許請求の範囲**【請求項 1】**

検体中の複数の異なる物質を検出するための検出素子であって、基体に設けられ、流体の複数の流れの層を形成可能な流路と、前記流路中に設けられ、前記検体中の複数の異なる物質を各々捕捉するための複数の異なる物質捕捉部とを備え、前記複数の異なる物質捕捉部は、流体の複数の流れの層に分れて分布し、流体と捕捉された物質との作用により検体中の各々の物質に対する独立の情報が得られるように配置されていることを特徴とする検出素子。

【請求項 2】

前記情報を検出するための検出部を更に備えていることを特徴とする請求項 1 記載の検出素子。

【請求項 3】

前記検体中の複数の異なる物質は標識を有し、前記複数の流れの層を流れる流体は前記標識と作用することにより作用物を放出させるための流体であることを特徴とする請求項 1 または 2 記載の検出素子。

【請求項 4】

前記標識が触媒作用を有する物質、電気化学的に発光する物質または蛍光物質であることを特徴とする請求項 1 乃至 3 のいずれかに記載の検出素子。

【請求項 5】

検体中の複数の異なる物質を検出するための検出方法であって、前記複数の異なる物質の各々を特異的に捕捉するための複数の異なる物質捕捉部を有する流路に前記検体を導入し、物質捕捉部で物質を捕捉する工程と、前記流路内に流体が流れる複数の流れの層を形成する工程と、前記複数の流れの層を切り替えて流体を流すことにより、流体と捕捉された物質との作用により検体中の各々の物質に対する独立の情報を得る工程とを有することを特徴とする検出方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】検出素子及び検出方法

【技術分野】

【0001】

本発明は検出素子及び検出方法に関し、特に微小流路内の流体の流れの層を利用した、検体中の複数の異なる物質を検出するための検出素子及び検出方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

触媒反応による生成物、例えば酵素反応による生成物を用いるバイオセンサとして、電気化学的手法は、簡便で安価であるため広く使用されている。さらに、近年では、検出部の電極の微小化により、微小電極を多数配置したアレイ型のセンサの開発も行われている（特許文献1参照）。

【0003】

アレイ型にすることにより、同一の被検体に対する2次元的な位置情報、物質の分布の動的変化を得ることが可能になる。また、アレイ状に配置されたそれぞれの電極が特異的に別個の被検体と反応することにより多項目検出を行うものもある（非特許文献1参照）。

【0004】

一方、マイクロ流体デバイスとして、微小流路中でサンプリング及び計測を行う測定装置がある。丹羽らは、微小流路と薄層流路を組み合わせた、オンラインバイオセンサーを提案し、連続的に微量の試料の定量分析を行っている（特許文献2参照）。

【特許文献1】特開2002-71620号公報

【特許文献2】特開平11-83784号公報

【非特許文献1】Kenichi Kojima, Atsunori Hiratsuka, Hiroaki Suzuki, Kazuyoshi Yano, Kazunori Ikebukuro, Isao Karube, "Analytical Chemistry" 2003, 75, p. 1116-1122

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

しかしながら、これらの手法のみでは、実際の測定サンプル（例えば、血液）に含まれる複数種の被検体を同時に同一の流路で分離し検出することは難しい。例えば、測定サンプルを複数の流路に振り分け、それぞれ流路中で目的の被検体を検出することも考えられるが、測定サンプルの必要量が多くなってしまう。また、1つの流路に検体中に含まれる複数の被検体を捕捉するための捕捉部位を形成した場合、触媒反応による生成物は、いくつかの被検体について同一の物質である場合が多く、触媒反応生成物は液体中での拡散が起こるため、どの被検体から生成された物質であるかを1つの検出部（例えば、電極）にて同定することは困難であった。

【0006】

本発明は、この様な背景技術に鑑みてなされたものであり、流路を利用した検出素子において、一つの流路を用いて流路を複数に分割しないため、複数の異なる物質を含有する微量の検体を分けることなく物質捕捉部に供給でき、また流路中に検出対象の異なる複数の物質捕捉部を形成することで、検体中に含まれる微量の複数の異なる物質を効率的に同時に検出することができる検出素子および検出方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明に係る第1の発明は、検体中の複数の異なる物質を検出するための検出素子であって、基体に設けられ、流体の複数の流れの層を形成可能な流路と、前記流路中に設けられ、前記検体中の複数の異なる物質を各々捕捉するための複数の異なる物質捕捉部とを備え、前記複数の異なる物質捕捉部は、流体の複数の流れの層に分れて分布し、流体と捕捉

された物質との作用により検体中の各々の物質に対する独立の情報が得られるように配置されていることを特徴とする検出素子である。

【0008】

前記情報を検出するための検出部を更に備えていることが好ましい。

前記検体中の複数の異なる物質は標識を有し、前記複数の流れの層を流れる流体は前記標識と作用することにより作用物を放出させるための流体であることが好ましい。

前記標識が触媒作用を有する物質、電気化学的に発光する物質または蛍光物質であることが好ましい。

【0009】

また、本発明に係る第2の発明は、検体中の複数の異なる物質を検出するための検出方法であって、前記複数の異なる物質の各々を特異的に捕捉するための複数の異なる物質捕捉部を有する流路に前記検体を導入し、物質捕捉部で物質を捕捉する工程と、前記流路内に流体が流れる複数の流れの層を形成する工程と、前記複数の流れの層を切り替えて流体を流すことにより、流体と捕捉された物質との作用により検体中の各々の物質に対する独立の情報を得る工程とを有することを特徴とする検出方法である。

【発明の効果】

【0010】

本発明は、流路を利用した検出素子において、一つの流路を用いて流路を複数に分割しないため、複数の異なる物質を含有する微量の検体を分けることなく物質捕捉部に供給でき、また流路中に検出対象の異なる複数の物質捕捉部を形成することで、検体中に含まれる微量の複数の異なる物質を効率的に同時に検出することができる検出素子および検出方法を提供することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明の検出素子は、検体中の複数の異なる物質を検出するための検出素子であって、基体に設けられ、流体の流れの層（以降、層状流と記す）を複数形成可能な流路と、前記物質を特異的に捕捉するために前記流路中に設けられた、複数の異なる物質捕捉部とを備え、前記物質捕捉部は、前記層状流の一方の層を流れる流体を切り替えることにより、前記物質に対する独立の情報が得られるように配置されていることを特徴とする。

【0012】

また、本発明の検出方法は、検体中の複数の異なる物質を検出する検出方法であって、前記物質を特異的に捕捉するため複数の異なる物質捕捉部を有する流路に前記検体を導入する工程と、前記流路内に複数の層状流を形成する工程と、前記層状流の一方の層を流れる流体を切り替えることにより、前記物質に対する独立の情報を得る工程とを有することを特徴とする。

【0013】

本発明の一般的な形態は、図1に代表されるような μ TAS (Micro Total Analysis Systems) 型の検出素子であって、図2のように、微小流路中に、検体中の物質と特異的に結合する抗体を物質捕捉部に固定化する。

【0014】

物質捕捉部は、流路中に複数形成され、検体中に含まれる複数種の物質をそれぞれ捕捉する。

物質捕捉部は、流路の複数の層状流の一方を流れる流体を切り替えることにより、物質に対する独立の情報が得られるように配置されている。ここで、層状流の一方の層を流れる流体とは、検体中に含まれる物質の有する標識と作用することにより、作用物を放出させるための流体（基質）であり、その放出された作用物を検出することにより物質捕捉部に捕捉された検体中の物質の量等の情報を得ることができる。

【0015】

標識としては、触媒作用を有する物質、電気化学的に発光する物質または蛍光物質等を

用いることができる。また、検体中に含まれる物質自体が、標識として働く場合もある。

検体中の物質の検出については、例えば、物質捕捉部に捕捉された検体と、物質特異的な2次抗体に酵素標識したものとの複合体を形成せしめ、物質捕捉部ごとに層状流を流れる流体を用いて酵素標識と作用する酵素基質を選択的に供給し、生成した酵素反応生成物(作用物)を物質捕捉部の下流に位置する検出用電極により検出する。

【0016】

検体としては、生体物質(タンパク質、核酸、糖鎖)やアレルゲン、バクテリア、ウイルス等の抗体が特異的に認識できるものが対象となる。

また、物質捕捉部に形成せしめる複合体は、触媒標識された2次捕捉体の他に、検体と2次捕捉体との複合体に対して特異的に結合する3次以降の触媒標識抗体でもよい。

【0017】

また、標識物質として、蛍光物質を使用した場合、選択的な検出には、層状流のpHを変更し、選択的にスペクトルシフトさせて行う。

触媒作用を有する物質としては、グルコース酸化酵素、コリン酸化酵素、ラクトース酸化酵素、西洋ワサビペルオキシダーゼが挙げられる。それぞれ、基質として、グルコース、コリン、ラクトース、ルミノールと過酸化水素が挙げられる。電気化学発光物質としては、トリス(ピピリジル)ルテニウムが挙げられる。蛍光標識物質としては、5-カルボキシフルオレセイン、Quene-1(8-アミノ-2-(トランス-2-アミノスチリル)-6-メトキシキノリン-N, N, N', N'-テトラ酢酸テトラナトリウム塩)、BCECF(2', 7'-ビス(カルボキシエチル)-4または5-カルボキシフルオレセイン)が挙げられる。

【0018】

本発明の検出素子により、検体中の複数の物質を検出するための物質捕捉部の集積化が可能となり、より少ない検体量で効率的に定量することができる。また、検体をマルチチャンネルに分割して流す必要が無く、検体を最大限有効に利用することができる。

【0019】

また、バイオセンサにおける検出方法により、それぞれの物質捕捉部からの信号(酵素反応生成物、化学発光、蛍光)を選択的に検出することが可能となり、それぞれの反応個所に特定した検出部を持つ必要が無く、検出部を共通化することができる。また、物質捕捉部、検出部の集積化、共通化が図れ、安価で、微小なセンサを作製することができる。

【実施例】

【0020】

以下、図面を参照して、本発明を実施例により更に具体的に説明する。なお、本発明は以下の実施例のみに限定されるものではない。

実施例1

図1は、本発明の一実施の形態におけるバイオセンサの構造を示すものである。ここでは、触媒作用を有する物質として、グルコース酸化酵素(GOX)を用いる。また、測定対象とする検体として、ヒト α フェトプロテイン(AFP)及びヒト β 2マイクログロブリン(β 2MG)を用いる。

【0021】

バイオセンサは、ポリジメチルシロキサン(PDMS)基板とガラス基板を張り合わせた構造を有している。PDMS基板上(図3参照)には、幅 $100\mu\text{m}$ 、深さ $100\mu\text{m}$ の矩形の微小流路14がパターンニングされている。ガラス基板上(図4参照)には、過酸化水素検出用の薄膜電極16, 17, 18および電極パッド19, 20, 21がパターンニングされている。前記電極および電極パッドは、チタン、白金を順にスパッタで積層し、形成されている。また、検体注入に用いる2つのインレット1, 2と、1つのドレイン3に用いる貫通孔(径 $100\mu\text{m}$)22, 23, 24を有する。参照電極上には、参照物質として銀をメッキしている。

【0022】

図2のように、物質捕捉部10、11は微小流路中に配置され、それぞれ、ウシ血清ア

ルブミン (BSA) を介してヒトAFPに対するウサギ由来抗体と、ヒト β 2MGに対するウサギ由来抗体をグルタルアルデヒド蒸気により架橋し固定化する。PDMS基板及びガラス基板は、自己吸着により張り合わせる。測定溶液としては、リン酸緩衝生理食塩水を用い、2つのインレット1, 2からそれぞれ流速 $2\mu\text{l}/\text{min}$ でシリンジポンプにより送液する。

【0023】

図6のように並んだ、参照電極、対向電極、作用電極の3つの電極パッド32, 33, 34は、ポテンシオスタットの端子にそれぞれ接続される。測定溶液中には、検体として、ヒトAFP及びヒト β 2MGの混合溶液を2つのインレットより送液すると、ヒトAFP及びヒト β 2MGは、それぞれに対する前記固定化抗体により物質捕捉部において結合する。次に、ヒトAFP及びヒト β 2MGに対する2次抗体(マウス由来)を送液する。最後に、3次抗体としてGOX修飾されたヤギ由来抗マウス抗体を送液し、図5のような複合体を形成させる。

【0024】

ここから、検体の定量を行う。ヒトAFP及びヒト β 2MGは、微小流路中独立に捕捉されており、それぞれの物質捕捉部にのみGOXの酵素基質であるグルタミン酸が流れるように、微小流路中に層状流71, 72を形成させる。このとき、2つインレット1, 2からは、一方のみグルタミン酸を含んだ緩衝溶液を流し、AFPあるいは β 2MGの一方のGOXからの過酸化水素のみを下流に配置されている薄膜電極16, 17, 18により還元電流として検出する。その後、グルタミン酸を導入するインレットを切り替え、前記とは別のGOXからの過酸化水素を検出する。これらの操作により、1つの微小流路中に捕捉された2種類の検体(AFPおよび β 2MG)を同一標識を用い、且つ1つの検出部のみで独立に検出することができる。

【0025】

実施例2

図7のような構造のバイオセンサを作製する。基板としてガラス基板を用いる。図9に示すような幅 $100\mu\text{m}$ 、深さ $50\mu\text{m}$ 微小流路48をウェットエッチング法により形成する。実施例1に於いて形成した層状流を更に厳密に検出し、基質の拡散を抑制し、物質捕捉部をより近接して形成できるようにする。これにより更なる物質捕捉部の高密度化が可能となる。

【0026】

本実施例では、図8のようにインレットは3つ形成される。中央のインレットは、層状流をより厳密に検出するために用いられる溶液を送液する。そのため、溶液としては、水系よりも有機系のものが望ましい。本実施例では、エタノールを用いる。中央のインレットにつながる微小流路表面は、他の2つの流路との合流地点の直前46で、疎水化処理し、他の2つのインレットから流れるリン酸緩衝生理食塩水溶液の逆流を防ぐ。疎水化処理には、フッ素化合物($\text{CF}_3(\text{CF}_2)_7\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}(\text{OMe})_3$)を用い、コートする。また、標識酵素としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)を用いる。

【0027】

実施例1と同様に、1次抗体を図8の物質捕捉部42, 43に固定化する。図10に示す様に、ガラス基板には、インレット、ドレイン用に貫通孔50, 51, 52及び53を形成しておく。2枚のガラス基板は、微小流路部分をマスクし、紫外線が当たらないようにした上で、紫外線硬化性の接着剤で張り合わせる。検体の測定は、まず、インレット36, 38から、ヒトAFP及びヒト β 2MGの混合溶液を流速 $2\mu\text{l}/\text{min}$ でシリンジポンプにより送液する。続けて、ヒトAFP及びヒト β 2MGに対する2次抗体(マウス由来)を送液する。最後に、3次抗体としてHRP修飾されたヤギ由来抗マウス抗体を送液し、図11のような複合体を形成させる。

【0028】

ここから、検体の定量を行う。ヒトAFP及びヒト β 2MGは、微小流路中独立に捕捉されており、それぞれの物質捕捉部42あるいは43にのみHRPの酵素基質であるルミ

ノールが流れるように、微小流路中に層状流を形成させる。このとき、2つインレット36、38からは、一方のみルミノール及び過酸化水素を含んだリン酸緩衝生理食塩水を流す。他方にはリン酸緩衝生理食塩水のみを流す。また、インレット37から、エタノールを流し、2つの水相を分離し、ルミノールの拡散を低減させる。HRPの触媒作用により、ルミノールと過酸化水素が反応し、3-アミノフタレイトジアニオンが生成し、同時に化学発光が起こる。発光強度を測定することで、物質捕捉部42あるいは43に結合した、被検体の定量を行う。

【0029】

その後、ルミノール及び過酸化水素を導入するインレットを切り替え、前記とは別のHRPに起因する化学発光を検出する。これらの操作により、1つの微小流路中に捕捉された2種類の検体（AFPおよび β 2MG）を同一標識により独立に検出することができる。

【0030】

実施例3

実施例1、2にある系において、酵素標識の代替として、蛍光標識を用いることができる。

層状流により流体のpHを特定の1層のみ変更し、蛍光標識の蛍光特性が変化することで、被検体の区別が可能となる。特定波長における蛍光強度あるいは蛍光スペクトルの変化を検出する。3次抗体の標識としてpH感受性蛍光色素5-カルボキシフルオレセインを用いて、実施例2と同様の検出が可能となる。

【産業上の利用可能性】

【0031】

本発明の検出素子および検出方法は、検体中に含まれる微量の複数物質を効率的に同時に検出することができるので、医療診断・健康診断・食品安全検査・環境汚染物質検査等のバイオセンサとして利用することができる。

【図面の簡単な説明】

【0032】

【図1】本発明のバイオセンサの構造の一例を示す概略図である。

【図2】実施例1の微小流路中の物質捕捉部の詳細図である。

【図3】実施例1のPDMS基板の構成を示す概略図である。

【図4】実施例1のガラス基板の構成を示す概略図である。

【図5】実施例1の物質捕捉部の反応模式図である。

【図6】実施例1の電極部の詳細図である。

【図7】実施例2に示すバイオセンサの構造を示す概略図である。

【図8】実施例2の微小流路中の物質捕捉部の詳細図である。

【図9】実施例2のガラス基板上の微小流路の構成を示す概略図である。

【図10】実施例2のガラス基板上の貫通孔の構成を示す概略図である。

【図11】実施例2の物質捕捉部の反応模式図である。

【符号の説明】

【0033】

1, 2 インレット

3 ドレイン

4, 5, 6 電極パッド

7 基板

9 微小流路

10, 11 物質捕捉部

13 PDMS基板

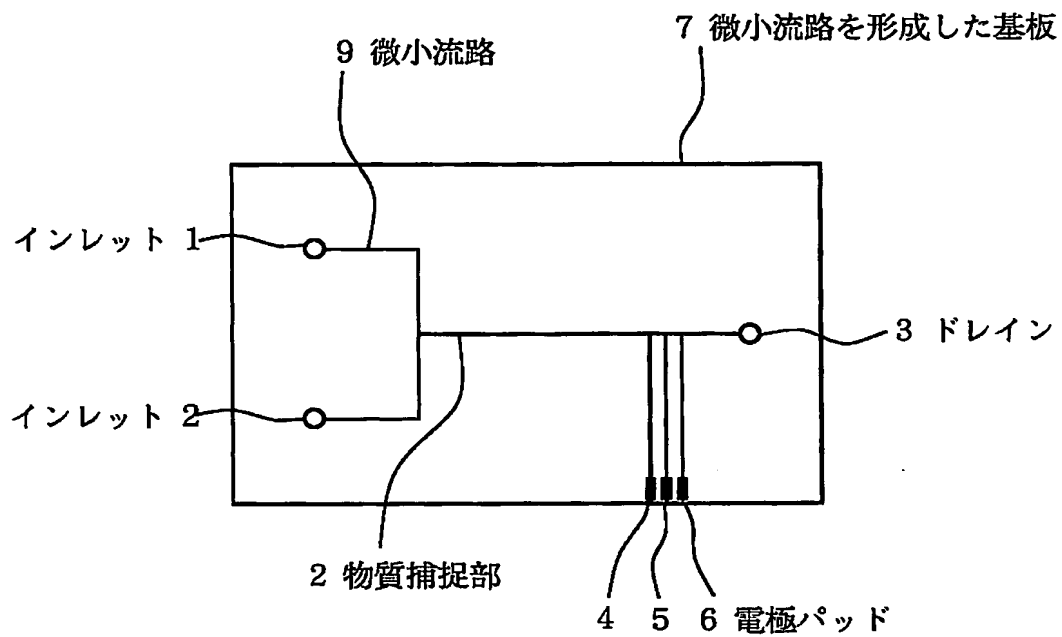
14 微小流路

15 ガラス基板

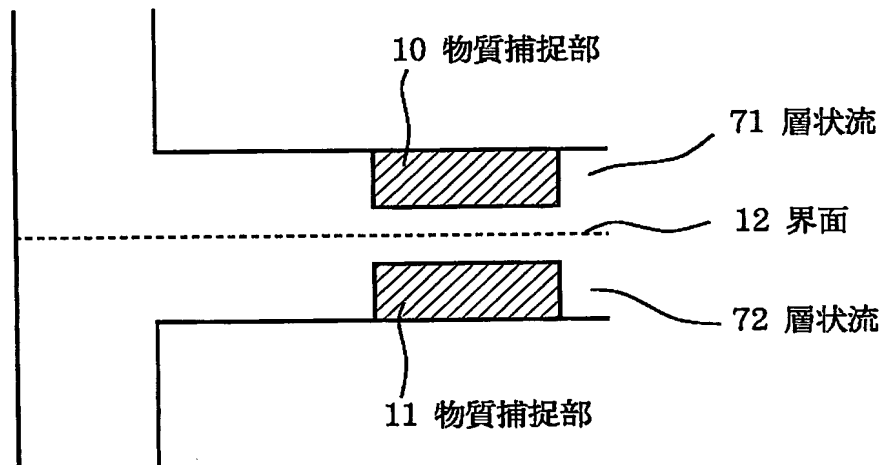
16, 17, 18 薄膜電極

1 9, 2 0, 2 1 電極パッド
2 2, 2 3, 2 4 貫通孔
3 2, 3 3, 3 4 電極パッド
3 5 微小流路
3 6、3 7、3 8 インレット
3 9 ドレイン
4 0 基板
4 2, 4 3 物質捕捉部
4 4、4 5 界面
4 6 疎水化処理部
4 7 基板
4 8 微小流路
4 9 ガラス基板
5 0、5 1、5 2、5 3 貫通孔
7 1、7 2 層状流

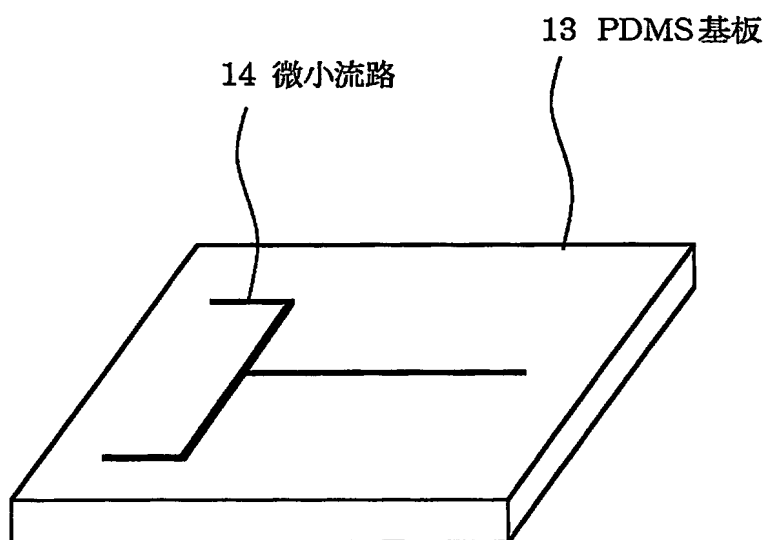
【書類名】 図面
【図 1】



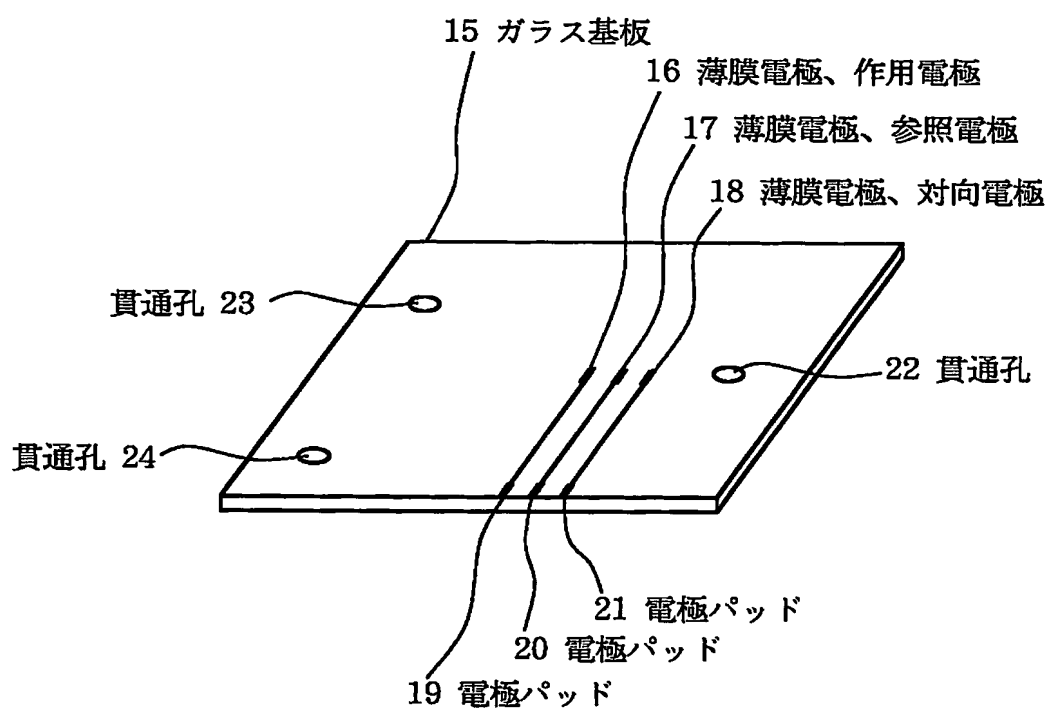
【図 2】



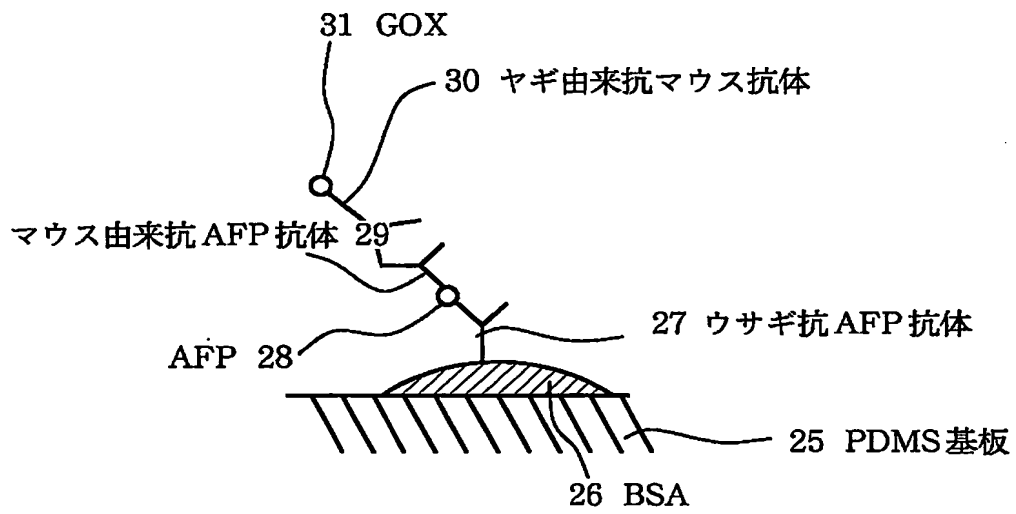
【図 3】



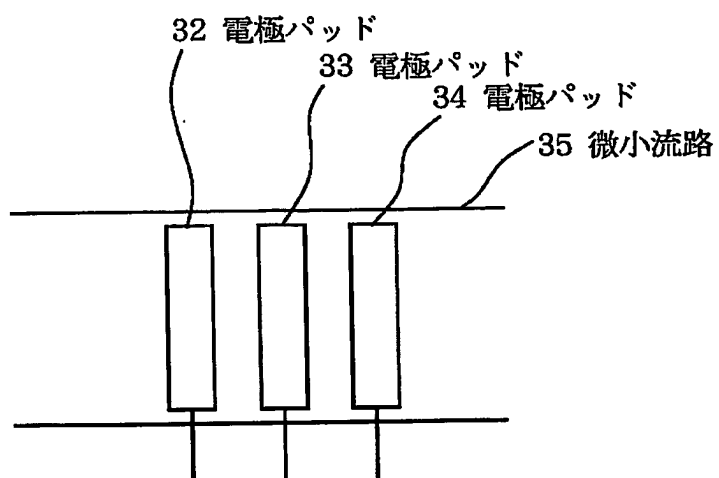
【図 4】



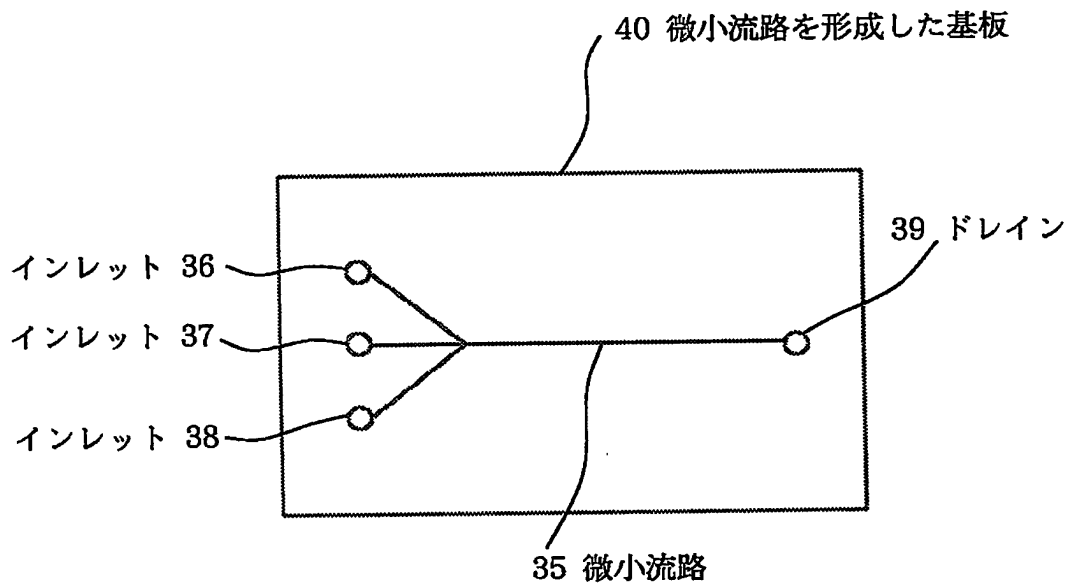
【図 5】



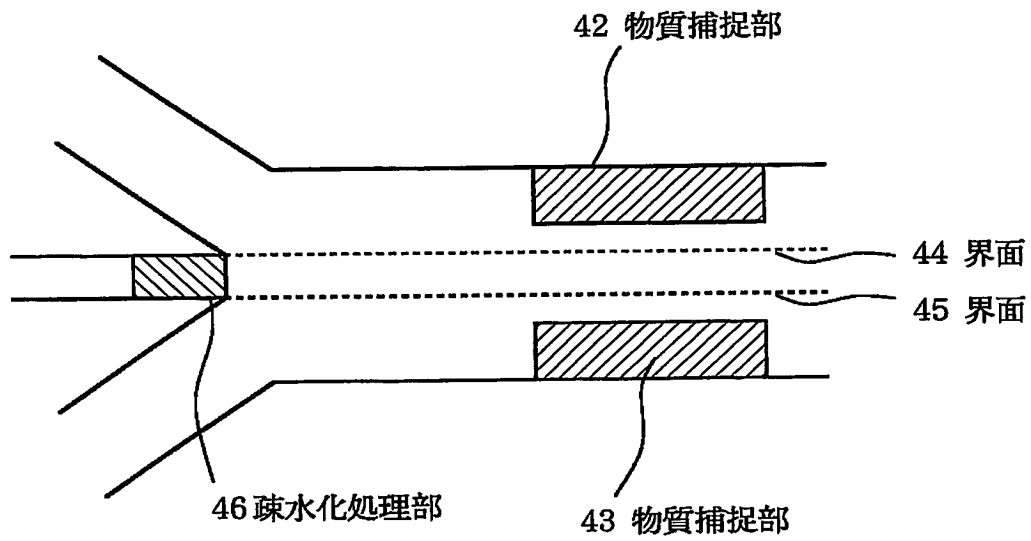
【図 6】



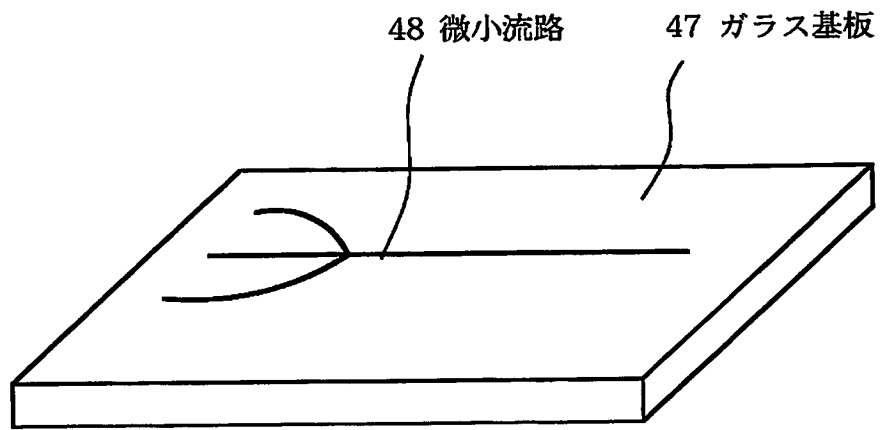
【図 7】



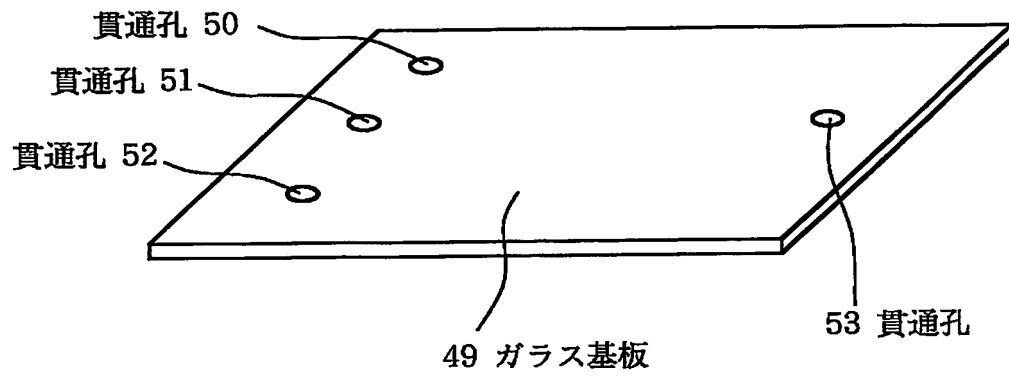
【図 8】



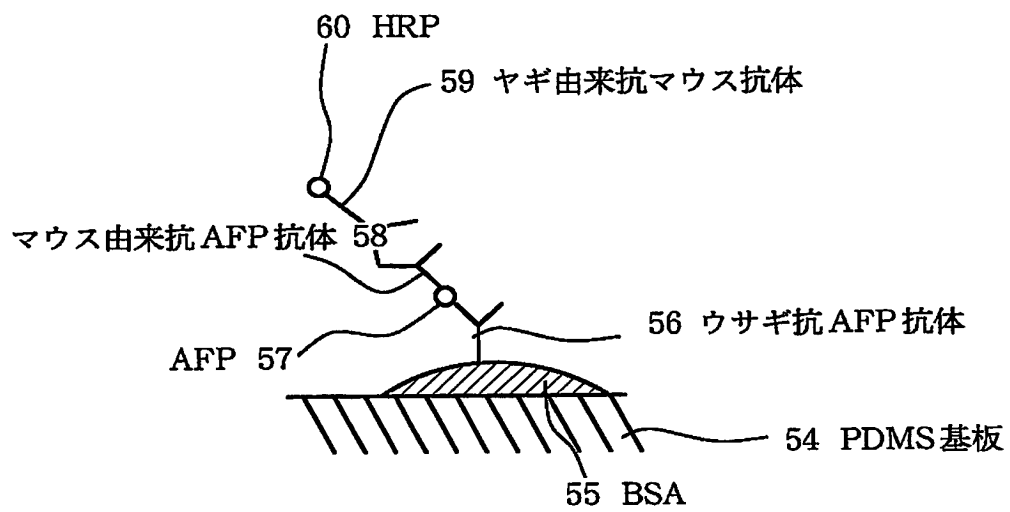
【図 9】



【図 10】



【図 11】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 検体中に含まれる微量の複数物質を効率的に同時に検出することができる検出素子を提供する。

【解決手段】 検体中の複数の異なる物質を検出するための検出素子であって、基体に設けられ、流体の複数の流れの層を形成可能な流路と、前記流路中に設けられ、前記検体中の複数の異なる物質を各々捕捉するための複数の異なる物質捕捉部 10、11 とを備え、前記複数の異なる物質捕捉部 10、11 は、流体の複数の流れの層 71、72 に分れて分布し、流体と捕捉された物質との作用により検体中の各々の物質に対する独立の情報が得られるように配置されている検出素子。

【選択図】 図 2

特願 2 0 0 4 - 0 1 5 9 7 4

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 1 0 0 7]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 3 0 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都大田区下丸子 3 丁目 3 0 番 2 号

氏 名

キャノン株式会社

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/000811

International filing date: 18 January 2005 (18.01.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-015974
Filing date: 23 January 2004 (23.01.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 03 March 2005 (03.03.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.